

阔叶丰花草的三萜酸类化学成分研究

罗应^{1,2}, 徐巧林³, 董丽梅^{1,2}, 周忠玉¹, 谭建文^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 广东省林业科学研究院, 广州 510520)

摘要: 为了解阔叶丰花草(*Spermacoce latifolia*)的化学成分, 从其全株乙醇提取物中分离得到7个三萜类化合物, 经过波谱分析, 他们的结构鉴定为: 熊果酸(1)、mesembryanthemoidigenic acid (2)、3 β ,6 β -dihydroxy-olean-12-ene-28-oic acid (3)、scutellaric acid (4)、arjunic acid (5)、29-hydroxyhederagenin (6)和3 β ,6 β ,23-trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid (7)。抗菌活性测试结果表明化合物1、3、4和7对部分测试菌株具有显著的抑制作用。

关键词: 阔叶丰花草; 化学成分; 三萜; 抗菌活性

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.04.015

Triterpenic Acids from *Spermacoce latifolia*

LUO Ying^{1,2}, XU Qiao-lin³, DONG Li-mei^{1,2}, ZHOU Zhong-yu¹, TAN Jian-wen^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China)

Abstract: In order to understand the chemical constituents of *Spermacoce latifolia*, seven compounds were isolated from its whole plant. On the basis of spectral data, they were identified as ursolic acid (1), mesembryanthemoidigenic acid (2), 3 β ,6 β -dihydroxy-olean-12-ene-28-oic acid (3), scutellaric acid (4), arjunic acid (5), 29-hydroxyhederagenin (6) and 3 β ,6 β ,23-trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid (7). Compounds 1, 3, 4 and 7 showed significant inhibitory activity toward parts of the assayed bacterial strains.

Key words: *Spermacoce latifolia*; Chemical constituent; Triterpenoids; Antibacterial activity

阔叶丰花草(*Spermacoce latifolia* Aubl.)为茜草科(Rubiaceae)丰花草属多年生草本植物, 原产南美洲, 现广泛分布于热带和亚热带地区。据文献报道, 阔叶丰花草根的汁液可用于治疗疟疾^[1-2]。目前, 人们已从丰花草属植物中分离得到了60多种化学成分, 包括生物碱类、环烯醚萜类、黄酮类、萜类及酚酸类, 部分化合物具有显著的生物活性^[3-5]。但迄今为止, 仅Kohei等报道了阔叶丰花草中的7个环烯醚萜苷和1个二萜^[6]。为了进一步揭示阔叶丰花草

的生物活性化学物质基础, 为阔叶丰花草的开发利用开辟新途径, 我们对该植物的化学成分进行了深入研究, 从其醇提物中分离鉴定了7个三萜类化合物。本文报道这些化合物的分离鉴定及其抑菌活性。

1 材料和方法

1.1 材料

阔叶丰花草(*Spermacoce latifolia* Aubl.)全株于

收稿日期: 2014-11-17

接受日期: 2014-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970453, 31270406); 中国科学院植物资源保护与持续利用重点实验室项目(KSCX2-EW-J-28, Y39000AF03)资助

作者简介: 罗应(1985~), 男, 在读博士研究生, 主要研究方向为天然产物化学。E-mail: luoyingps@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: jwttan@scbg.ac.cn

2012年9月采自中国科学院华南植物园,经该园邢福武研究员鉴定为阔叶丰花草(*Spermacoce latifolia* Aubl.)。标本存放于中国科学院华南植物园生物有机化学实验室。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CMCC26003、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) CMCC63302、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) CMCC63501、大肠杆菌(*Escherich coli*) CMCC44102、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) CMCC44102 和痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*) CMCC51252 购买于广州微生物研究所。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)由中国科学院华南植物园魏孝义研究员课题组提供。

1.2 仪器

ESI-MS 用 API 2000 LC/MS/MS (美国 Applied Biosystems 公司); ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 用 Bruker DRX-500 型超导核磁共振仪测定(瑞士 Bruker 公司),以四甲基硅烷(TMS)为内标。减压浓缩系统采用日本东京理化公司 N-1000 旋转蒸发仪、CCA-1110 循环式冷却箱和 SB-1000 电热恒温水浴锅;中压半制备采用上海利穗科技有限公司的 Dr Flash-S 分离纯化系统。柱色谱正相层析硅胶为青岛海洋化工有限公司产品(80~100 目, 200~300 目);反相

层析硅胶 YMC ODS-A (50 μm)为日本 YMC 公司生产;薄层色谱正相硅胶板(HFGF₂₅₄)为山东烟台江友硅胶开发有限公司产品;凝胶 Sephadex LH-20 为瑞典 Amersham Biosciences 公司产品。DMSO、甲醇为分析纯(天津富宇试剂公司);氘代试剂为 Sigma 公司产品。牛肉膏、蛋白胨、 MnSO_4 等生化试剂购自广州海波生物技术有限公司。刃天青和硫酸卡那霉素均购买于 Sigma 公司。

1.3 提取和分离

干燥的阔叶丰花草全株 15.0 kg,粉碎后于室温用 95% 乙醇提取,提取液合并后减压浓缩得无醇浸膏。浸膏加水混悬,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,得石油醚部分(1.0 kg)、乙酸乙酯部分(606.4 g)和正丁醇部分(576.2 g)。

石油醚部分经正相硅胶柱层析(200~300 目),以石油醚-丙酮(100:0~0:100, V/V)梯度洗脱,经 TLC 薄层层析检测合并主点相同的流分,共得到 9 个组分($E_1\sim E_9$)。 E_6 (15.0 g)经 MCI 柱除去色素,得到甲醇洗脱部分 E_{6-1} 。 E_{6-1} (9.0 g)依次通过反相中压柱层析分离纯化,甲醇/水(30:70~100:0)为流动相梯度洗脱、Sephadex LH-20 凝胶柱以甲醇洗脱和正相硅胶层析柱(200~300 目)分离纯化,以氯仿-甲醇(100:1)恒定梯度洗脱,得到化合物 1 (50.0 mg) 和 2 (6.4 mg)。

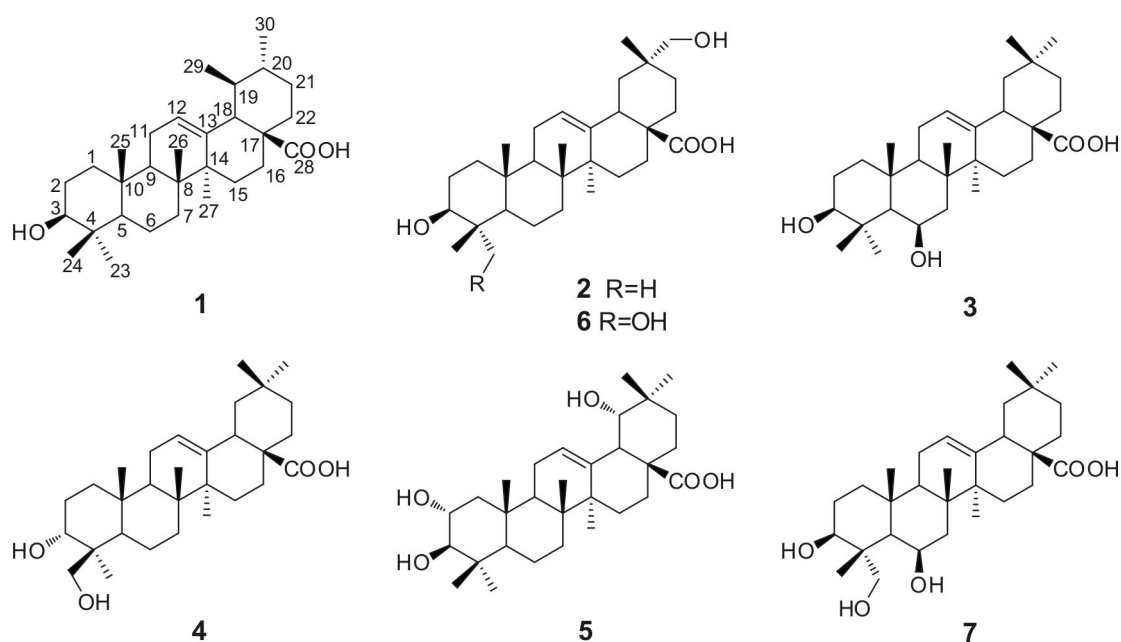


图1 化合物 1~7 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-7

乙酸乙酯部分(606.4 g)经正相硅胶柱层析(200~300目),以氯仿-甲醇(100:1~0:100)梯度洗脱,经TLC薄层层析检测合并主点相同的流分,得到F₁~F₉,共9个组分。F₅(10.0 g)继续经反相中压柱层析分离纯化,甲醇/水(30:70~100:0)为流动相梯度洗脱,TLC薄层检测合并主点相同的流分,得到6个亚组分(F_{5.1}~F_{5.6})。F_{5.4}(6.0 g)经Sephadex LH-20凝胶柱以甲醇洗脱,再经正相硅胶层析柱(200~300目)分离纯化,以氯仿-甲醇(50:1)恒定梯度洗脱,得到化合物**3**(12.6 mg)、**4**(6.6 mg)、**5**(14.0 mg)和**7**(10.0 mg)。F_{5.5}(1.0 g)经Sephadex LH-20凝胶柱以甲醇洗脱,得到化合物**6**(8.0 mg)。

1.4 结构鉴定

熊果酸 (Ursolic acid, 1) 白色粉末; $[\alpha]_D^{25} +58.5$ (*c* 0.24, 甲醇); IR_{max}^{KBr} vcm⁻¹: 3430 (羟基), 1694 (羰基), 1454 (苯基), 1380 (甲基); ESI-MS *m/z*: 479 [M + Na]⁺, 455 [M - H]⁻, 248 (100), 203 (50), 133 (50), 推测分子式为 C₃₀H₄₈O₃; ¹H NMR (500 MHz, C₅D₅N): δ 5.25 (1H, t, *J* = 3.5 Hz, H-12), 3.49 (1H, m, H-3), 2.66 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-18), 1.27 (3H, s), 1.26 (3H, s), 1.06 (3H, s), 1.05 (3H, s), 1.03 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-30), 0.98 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H-29), 0.92 (3H, s); ¹³C NMR (125 MHz, C₅D₅N): δ 39.6 (CH₂, C-1), 28.6 (CH₂, C-2), 78.7 (CH, C-3), 39.9 (C, C-4), 56.3 (CH, C-5), 19.3 (CH₂, C-6), 34.1 (CH₂, C-7), 40.5 (C, C-8), 48.6 (CH, C-9), 37.8 (C, C-10), 24.2 (CH₂, C-11), 126.2 (CH, C-12), 139.8 (C, C-13), 43.0 (C, C-14), 29.2 (CH₂, C-15), 25.4 (CH₂, C-16), 48.6 (C, C-17), 54.1 (CH, C-18), 40.0 (CH, C-19), 39.3 (CH, C-20), 31.6 (CH₂, C-21), 38.0 (CH₂, C-22), 29.3 (CH₃, C-23), 16.2 (CH₃, C-24), 17.1 (CH₃, C-25), 18.0 (CH₃, C-26), 24.4 (CH₃, C-27), 180.5 (C, C-28), 18.1 (CH₃, C-29), 22.0 (CH₃, C-30)。光谱数据与文献[7]报道基本一致,故确定该化合物为熊果酸(ursolic acid)。

Mesembryanthemoidigenic acid (2) 白色粉末; $[\alpha]_D^{25} +70.5$ (*c* 0.28, 甲醇); IR_{max}^{KBr} vcm⁻¹: 3425 (羟基), 1695 (羰基), 1450 (苯基), 1385 (甲基); ESI-MS *m/z*: 495 [M + Na]⁺, 471 [M - H]⁻, 264 (48), 233 (100), 207 (23), 201(46), 推测分子式为 C₃₀H₄₈O₄; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.25 (1H, t, *J* = 3.5 Hz, H-12), 3.19 (2H, s, H-29), 3.15 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.7 Hz, H-3), 2.88 (1H, dd, *J* = 13.0, 4.7 Hz, H-18),

1.17 (3H, s), 0.97 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.82 (3H, s), 0.78 (3H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 38.5 (CH₂, C-1), 27.6 (CH₂, C-2), 79.7 (CH, C-3), 38.9 (C, C-4), 56.7 (CH, C-5), 18.3 (CH₂, C-6), 32.9 (CH₂, C-7), 39.8 (C, C-8), 46.5 (CH, C-9), 36.8 (C, C-10), 23.2 (CH₂, C-11), 123.7 (CH, C-12), 145.2 (C, C-13), 42.7 (C, C-14), 28.7 (CH₂, C-15), 24.0 (CH₂, C-16), 47.6 (C, C-17), 40.6 (CH, C-18), 40.3 (CH₂, C-19), 35.5 (C, C-20), 29.6 (CH₂, C-21), 38.0 (CH₂, C-22), 28.3 (CH₃, C-23), 16.3 (CH₃, C-24), 15.9 (CH₃, C-25), 17.7 (CH₃, C-26), 25.4 (CH₃, C-27), 181.9 (C, C-28), 74.4 (CH₂, C-29), 19.5 (CH₃, C-30)。光谱数据与文献[8]报道一致,故确定该化合物为 mesembryanthemoidigenic acid。

3β,6β-Dihydroxy-olean-12-ene-28-oic acid (3)

白色粉末; $[\alpha]_D^{25} +52.8$ (*c* 1.0, 甲醇); IR_{max}^{KBr} vcm⁻¹: 3428 (羟基), 1696 (羰基), 1452 (苯基), 1382 (甲基); ESI-MS *m/z*: 495 [M + Na]⁺, 471 [M - H]⁻, 362 (12), 248 (100), 203 (90), 推测分子式为 C₃₀H₄₈O₄; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.30 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-12), 4.51 (1H, br s, H-6), 3.10 (1H, dd, *J* = 11.6, 4.1 Hz, H-3), 2.89 (1H, dd, *J* = 13.7, 4.2 Hz, H-18), 1.32 (3H, s), 1.18 (3H, s), 1.15 (3H, s), 1.11 (3H, s), 1.06 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.93 (3H, s); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 42.0 (CH₂, C-1), 28.1 (CH₂, C-2), 80.1 (CH, C-3), 40.1 (C, C-4), 57.1 (CH, C-5), 68.7 (CH, C-6), 41.6 (CH₂, C-7), 40.7 (C, C-8), 49.4 (CH, C-9), 37.7 (C, C-10), 24.5 (CH₂, C-11), 123.9 (CH, C-12), 144.5 (C, C-13), 43.4 (C, C-14), 28.7 (CH₂, C-15), 24.0 (CH₂, C-16), 47.7 (C, C-17), 40.6 (CH, C-18), 47.3 (CH₂, C-19), 30.5 (C, C-20), 33.6 (CH₂, C-21), 32.0 (CH₂, C-22), 28.3 (CH₃, C-23), 17.6 (CH₃, C-24), 17.3 (CH₃, C-25), 18.8 (CH₃, C-26), 26.4 (CH₃, C-27), 181.9 (C, C-28), 23.9 (CH₃, C-29), 31.8 (CH₃, C-30)。光谱数据与文献[9]报道一致,故确定该化合物为 3β,6β-dihydroxy-olean-12-ene-28-oic acid。

Scutellaric acid (4) 白色粉末; $[\alpha]_D^{25} +35.8$

(*c* 1.0, 甲醇); IR_{max}^{KBr} vcm⁻¹: 3400 (羟基), 1690 (羰基), 1450 (苯基), 1386 (甲基); ESI-MS *m/z*: 495 [M + Na]⁺, 471 [M - H]⁻, 248 (100), 233 (10), 203 (89), 133 (10), 推测分子式为 C₃₀H₄₈O₄; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.26 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-12), 3.63 (1H, m,

H-3), 3.70, 3.44, (each 1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-23), 2.87 (1H, dd, $J = 13.8, 4.2$ Hz, H-18), 1.15 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.06 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.72 (3H, s); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 33.2 (CH_2 , C-1), 26.1 (CH_2 , C-2), 73.9 (CH, C-3), 40.6 (C, C-4), 43.5 (CH, C-5), 18.7 (CH_2 , C-6), 33.6 (CH_2 , C-7), 39.7 (C, C-8), 49.4 (CH, C-9), 37.7 (C, C-10), 23.5 (CH_2 , C-11), 122.8 (CH, C-12), 144.5 (C, C-13), 42.4 (C, C-14), 28.7 (CH_2 , C-15), 24.0 (CH_2 , C-16), 47.7 (C, C-17), 42.1 (CH, C-18), 46.3 (CH_2 , C-19), 31.5 (C, C-20), 34.2 (CH_2 , C-21), 33.1 (CH_2 , C-22), 68.3 (CH_2 , C-23), 18.6 (CH_3 , C-24), 15.3 (CH_3 , C-25), 17.8 (CH_3 , C-26), 26.4 (CH_3 , C-27), 181.7 (C, C-28), 23.9 (CH_3 , C-29), 33.8 (CH_3 , C-30)。光谱数据与文献[10]报道一致,故确定该化合物为 scutellaric acid。

Arjunic acid (5) 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +28.8$ (c 2.0, 甲醇); $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{vcm}^{-1}$: 3427 (羟基), 1695 (羰基), 1459 (苯基), 1386 (甲基); ESI-MS m/z : 511 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 487 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 453 (100), 435 (7), 425 (7), 407 (53), 推测分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 5.31 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12), 3.62 (1H, m, H-2), 3.24 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-19), 3.05 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-18), 2.90 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 1.31 (3H, s), 1.03 (3H, s), 1.00 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.84 (3H, s), 0.76 (3H, s); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 48.2 (CH_2 , C-1), 69.6 (CH, C-2), 84.9 (CH, C-3), 40.6 (C, C-4), 57.0 (CH, C-5), 19.7 (CH_2 , C-6), 34.0 (CH_2 , C-7), 40.9 (C, C-8), 49.4 (CH, C-9), 39.7 (C, C-10), 25.1 (CH_2 , C-11), 124.8 (CH, C-12), 144.9 (C, C-13), 42.7 (C, C-14), 29.7 (CH_2 , C-15), 28.6 (CH_2 , C-16), 46.7 (C, C-17), 45.1 (CH, C-18), 82.3 (CH, C-19), 36.2 (C, C-20), 29.5 (CH_2 , C-21), 34.1 (CH_2 , C-22), 29.3 (CH_3 , C-23), 17.5 (CH_3 , C-24), 17.1 (CH_3 , C-25), 17.8 (CH_3 , C-26), 25.4 (CH_3 , C-27), 181.7 (C, C-28), 25.2 (CH_3 , C-29), 28.8 (CH_3 , C-30)。光谱数据与文献[11]报道一致,故确定该化合物为 arjunic acid。

29-Hydroxyhederagenin (6) 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +26.0$ (c 0.1, 甲醇); $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{vcm}^{-1}$: 3410 (羟基), 1694 (羰基), 1455 (苯基), 1386 (甲基); ESI-MS m/z : 511 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 487 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 264 (67), 248 (47), 233 (100), 推测分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 5.26 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-12), 3.60 (1H,

dd, $J = 11.9, 4.2$ Hz, H-3), 3.53, 3.33, (each 1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-23), 3.19 (2H, s, H-29), 2.88 (1H, dd, $J = 13.9, 4.3$ Hz, H-18), 1.19 (3H, s), 0.98 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.82 (3H, s), 0.70 (3H, s); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 38.2 (CH_2 , C-1), 26.1 (CH_2 , C-2), 75.3 (CH, C-3), 40.6 (C, C-4), 49.5 (CH, C-5), 18.7 (CH_2 , C-6), 32.6 (CH_2 , C-7), 39.7 (C, C-8), 47.4 (CH, C-9), 36.7 (C, C-10), 22.8 (CH_2 , C-11), 122.8 (CH, C-12), 144.5 (C, C-13), 41.4 (C, C-14), 27.7 (CH_2 , C-15), 23.2 (CH_2 , C-16), 47.7 (C, C-17), 40.7 (CH, C-18), 40.7 (CH_2 , C-19), 35.6 (C, C-20), 28.8 (CH_2 , C-21), 32.1 (CH_2 , C-22), 68.3 (CH_2 , C-23), 11.6 (CH_3 , C-24), 15.3 (CH_3 , C-25), 16.8 (CH_3 , C-26), 25.4 (CH_3 , C-27), 182.7 (C, C-28), 73.4 (CH_2 , C-29), 18.8 (CH_3 , C-30)。光谱数据与文献[12]报道一致,故确定该化合物为 29-hydroxyhederagenin。

3 β ,6 β ,23-Trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid (7) 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +20.3$ (c 1.5, 甲醇); $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{vcm}^{-1}$: 3440 (羟基), 1695 (羰基), 1450 (苯基), 1386 (甲基); ESI-MS m/z : 511 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 487 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 288 (40), 248 (100), 203 (60), 推测分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 5.29 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12), 4.39 (1H, br s, H-6), 3.56 (1H, m, H-3), 3.60, 3.47, (each 1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-23), 2.87 (1H, dd, $J = 13.7, 3.9$ Hz, H-18), 1.33 (3H, s), 1.14 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.06 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.91 (3H, s); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 41.2 (CH_2 , C-1), 28.1 (CH_2 , C-2), 73.5 (CH, C-3), 44.0 (C, C-4), 49.5 (CH, C-5), 68.6 (CH, C-6), 41.0 (CH_2 , C-7), 39.3 (C, C-8), 48.7 (CH, C-9), 36.9 (C, C-10), 23.7 (CH_2 , C-11), 122.8 (CH, C-12), 144.5 (C, C-13), 42.4 (C, C-14), 28.7 (CH_2 , C-15), 24.0 (CH_2 , C-16), 46.7 (C, C-17), 42.1 (CH, C-18), 46.3 (CH_2 , C-19), 31.0 (C, C-20), 34.2 (CH_2 , C-21), 33.1 (CH_2 , C-22), 66.7 (CH_2 , C-23), 14.6 (CH_3 , C-24), 17.5 (CH_3 , C-25), 18.8 (CH_3 , C-26), 26.4 (CH_3 , C-27), 181.9 (C, C-28), 23.7 (CH_3 , C-29), 33.2 (CH_3 , C-30)。光谱数据与文献[13]报道一致,故确定该化合物为 3 β ,6 β ,23-trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid。

2 抗菌活性

采用刃天青显色法^[14]对化合物 1~7 进行人体

病原菌的最低抑菌浓度(MIC)测定,包括金黄色葡萄球菌、耐药性金黄色葡萄球菌(MRSA)、蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌。使用96孔板稀释,可以在同一时间测定不同化合物对不同菌种的MIC。先将100 μL 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的指示剂溶液(刃天青)放置到无菌的96孔板上的第11列板孔里;约7.5 mL的指示剂溶液与5 mL的待测菌溶液(10^6 CFU mL^{-1})混合;接着转移100 μL 到第1至第10列以及第12列所有测试孔中;将100 μL 待测样品溶液(1 mg mL^{-1})加入到第一列板孔中,再从第一列取出100 μL 溶液转移到第二列,接下列用同样的方法(倍增稀释)到第10列,再从第10列取出100 μL 弃掉以保证每一列孔中的溶液均为100 μL 。最后,将加好样品的孔板放入到恒温培养箱,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养5~6 h,直到孔板的颜色变成生长色:粉红色。检测活性标准:若颜色无变化仍为蓝色表示有活性,颜色从蓝

色变为粉红色,表示无抑菌活性;发生颜色变化的最低稀释浓度被认为是待测化合物的最低抑菌浓度(MIC)。在一个96孔板,可同时测定6个样品以及1个阳性对照和1个阴性对照。每个处理重复3次,硫酸卡那霉素作为阳性对照。

从表1可见,化合物**1**和**7**对MRSA有显著的抑制作用, MIC值分别为7.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 和31.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$,而阳性对照硫酸卡那霉素对MRSA的MIC值为125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。化合物**1**, **3**和**7**对金黄色葡萄球菌的MIC分别为7.8、3.9和15.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$,对蜡样芽孢杆菌的MIC分别为31.2、15.6和15.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$,对枯草芽孢杆菌的MIC均为31.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$,表明均有抑制活性。化合物**4**对枯草芽孢杆菌有较好的抑制作用, MIC值为7.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。此外,化合物**1**还对痢疾志贺氏菌有抑制活性, MIC值为15.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。化合物**2**、**5**和**6**对上述7株供试菌没有抑制活性(MIC>200 $\mu\text{g mL}^{-1}$)。

表1 化合物**1**~**7**对细菌的最低抑菌浓度($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Table 1 MIC values ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of compounds **1**~**7** against seven bacterial strains

菌株 Strain	化合物 Compound							硫酸卡那霉素 Kalaycin sulfate
	1	2	3	4	5	6	7	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	7.8	>200	31.2	>200	>200	>200	31.2	0.9
MRSA	7.8	>200	>200	>200	>200	>200	31.2	125
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	3.9	>200	15.6	>200	>200	>200	31.2	0.9
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	15.6	>200	15.6	7.8	>200	>200	31.2	0.9
大肠杆菌 <i>Escherich coli</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	0.9
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	0.9
痢疾志贺氏菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	15.6	>200	>200	>200	>200	>200	>200	0.9

3 结果和讨论

本研究从阔叶丰花草的乙醇提取物中分离鉴定出7个三萜类化合物,分别为:熊果酸(**1**)、mesembryanthemoidigenic acid (**2**)、 $3\beta,6\beta$ -dihydroxy-olean-12-ene-28-oic acid (**3**)、scutellaric acid (**4**)、arjunic acid (**5**)、29-hydroxyhederagenin (**6**)和 $3\beta,6\beta,23$ -trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid (**7**)。化合物**1**~**7**均为首次从该植物中分离得到。

利用刃天青染色法,我们对化合物**1**~**7**进行了体外抗菌活性实验,结果表明,化合物**1**和**7**对MRSA的抑制作用显著强于阳性对照硫酸卡那霉

素。化合物**1**、**3**和**7**对金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌均有抑制活性,而化合物**4**仅对枯草芽孢杆菌有较好的抑制作用。另外,化合物**1**对痢疾志贺氏菌也具有抑制活性。

本研究结果表明,阔叶丰花草中含有丰富的三萜酸类化学成分。活性分析试验进一步揭示,这些三萜类成分在抑菌方面具有潜在重要的价值用途,它们可能为阔叶丰花草的主要活性成分之一。

参考文献

- [1] Pereira Z V, de Carvalho-Okano R M, Garcia F C P. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, MG, Brasil [J].

- Acta Bot Bras, 2006, 20(1): 207–224.
- [2] Manandlar N P. An inventory of some vegetable drug resources of Makawanpur District, Nepal [J]. Fitoterapia, 1995, 66(3): 231–238.
- [3] Zamora-Martinez M C, de Pascual P C N. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico [J]. J Ethnopharmacol, 1992, 35(3): 229–257.
- [4] Moreira V F, Oliveira R R, Mathias L, et al. New chemical constituents from *Borreria verticillata* (Rubiaceae) [J]. Helv Chim Acta, 2010, 93(9): 1751–1757.
- [5] Vieira I J C, Mathias L, Braz-Filho R, et al. Iridoids from *Borreria verticillata* [J]. Org Lett, 1999, 1(8): 119–1171.
- [6] Kohei K, Yasuhiro F, Yasuhisa S, et al. Studies on the constituents of Indonesian *Borreria latifolia* [J]. Heterocycles, 2002, 56(1/2): 537–544.
- [7] Hung C Y, Yen G C. Extraction and identification of antioxidative components of hsian-tsoa (*Mesona procumbens* Hemsl.) [J]. LWT- Food Sci Techn, 2001, 34(5): 306–311.
- [8] Magina M D A, Dalmarco E M, Dalmarco J B, et al. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis* [J]. Quim Nova, 2012, 35(6): 1184–1188.
- [9] Huu B C, Phung N K P. Contribution to the study on chemical constituents of *Hedyotis crassifolia* L. (Rubiaceae) [J]. J Chem, 2007, 45(3): 363–367.
- [10] Kuo Y H, Lin Y L, Lee S M. Scutellaric acid, a new triterpene from *Scutellaria rivularis* [J]. Chem Pharm Bull, 1988, 36(9): 3619–3622.
- [11] Ponou B K, Teponno R B, Ricciutelli M, et al. Novel 3-oxo- and 3,24-dinor-2,4-secooleanane-type triterpenes from *Terminalia ivorensis* A. Chev [J]. Chem Biodiv, 2011, 8(7): 1301–1309.
- [12] Lavaud C, Crublet M L, Pouny I, et al. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Elatostachys apetala* [J]. Phytochemistry, 2001, 57(3): 469–478.
- [13] Khan I A, Sticher O, Rali T. New triterpenes from the leaves of *Timonius timon* [J]. J Nat Prod, 1993, 56(12): 2163–2165.
- [14] Rahman M M, Gray A I. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity [J]. Phytochemistry, 2005, 66(13): 1601–1606.